



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C07K 14/47, A61K 31/00, 38/00	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 98/30588 (43) Date de publication internationale: 16 juillet 1998 (16.07.98)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR98/00009 (22) Date de dépôt international: 6 janvier 1998 (06.01.98) (30) Données relatives à la priorité: 97/00071 7 janvier 1997 (07.01.97) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): LABORATOIRE LAPHAL (LABORATOIRE DE PHARMACOLOGIE APPLIQUEE) [FR/FR]; Avenue de Provence, F-13190 Allauch (FR). (72) Inventeur; et (75) Inventeur/Déposant (US seulement): CHAPUS, Catherine [FR/FR]; 10, rue Dragon, F-13006 Marseille (FR). (74) Mandataire: CABINET ORES; 6, avenue de Messine, F-75008 Paris (FR).		(81) Etats désignés: AL, AU, BA, BB, BG, BR, CA, CN, CU, CZ, EE, GE, HU, ID, IL, IS, JP, KP, KR, LC, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, SL, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>
(54) Title: SPECIFIC PANCREATIC LIPASE INHIBITORS AND THEIR APPLICATIONS (54) Titre: INHIBITEURS SPECIFIQUES DE LA LIPASE PANCREATIQUE ET LEURS APPLICATIONS (57) Abstract <p>The invention concerns specific pancreatic lipase inhibitors and their applications in the treatment and prevention of cardiovascular diseases, of hyperlipemia and of obesity, as well as diagnostic reagent and as regulating agent in a process of controlled lipolysis of triglycerides. Said inhibitors correspond in particular to a peptide consisting of a C-terminal fragment of pancreatic lipase including the recognition site of a colipase.</p> (57) Abrégé <p>Inhibiteurs spécifiques de la lipase pancréatique et leurs applications dans le traitement et la prévention des maladies cardiovasculaires, de l'hyperlipémie et de l'obésité, ainsi qu'en tant que réactif de diagnostic et en tant qu'agent de régulation dans un procédé de lipolyse ménagée de triglycérides. Lesdits inhibiteurs correspondent notamment à un peptide constitué d'un fragment C-terminal de lipase pancréatique incluant le site de reconnaissance d'une colipase.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

INHIBITEURS SPECIFIQUES DE LA LIPASE PANCREATIQUE ET LEURS APPLICATIONS.

La présente invention est relative à des inhibiteurs spécifiques de la lipase pancréatique et à leurs applications dans le traitement et la prévention des maladies cardiovasculaires, de l'hyperlipémie et de l'obésité, ainsi qu'en tant que réactif de diagnostic et en tant qu'agent de régulation dans un procédé de lipolyse ménagée de triglycérides.

Les graisses alimentaires représentent une source efficace d'énergie pour l'organisme. En effet, la quantité d'énergie métabolisée à partir des lipides est significativement plus importante que celle métabolisée à partir des carbohydrates ou des protéines. Cependant, la quasi-totalité des lipides ingérés étant assimilés par l'organisme, une surcharge alimentaire en lipides peut provoquer des troubles de santé importants : troubles cardiovasculaires, hyperlipémies et obésité.

Ces troubles sont fréquemment rencontrés dans les pays industrialisés où les populations ont souvent des régimes alimentaires trop riches en graisses saturées.

Pour lutter contre ces différentes pathologies, une hygiène alimentaire consistant à limiter l'ingestion de corps gras est nécessaire mais pas toujours suffisante. En effet, si certains corps gras sont faciles à détecter et à éliminer de l'alimentation (beurre, huiles...), d'autres, de par leur intégration dans les aliments (viandes, laitages...) le sont beaucoup moins.

Dans les cas où la mise en place d'un régime alimentaire s'avère insuffisante, des traitements pharmacologiques sont alors proposés. La plupart des traitements actuels visent surtout à lutter contre les hyperlipémies en utilisant, entre autres, des inhibiteurs de la synthèse du cholestérol.

Mais, les recherches actuelles se tournent, de plus en plus, vers des produits induisant une inhibition plus générale de l'activité lipolytique.

Dans une telle perspective, l'une des orientations qui a été particulièrement étudiée est celle de l'inhibition de la lipase pancréatique, qui est une enzyme-clé de la digestion des triglycérides alimentaires ; la digestion de ces derniers, constituants majeurs des lipides (environ 95 %), amorcée dans le tractus digestif supérieur par les lipases d'origine préduodénales (lipase gastrique chez l'homme), est essentiellement

réalisée dans l'intestin, sous l'action de la lipase pancréatique. Cette dernière transforme les triglycérides en acides gras libres et en 2-monoglycérides, produits d'hydrolyse plus polaires, capables de franchir la membrane de la bordure en brosse des entérocytes, après incorporation dans des micelles mixtes de sels biliaires et phospho-
5 lipides.

La lipase pancréatique joue donc un rôle dans l'émergence de maladies liées à la présence d'un excès de lipides, telles que les maladies cardiovasculaires, les hyperlipémies et l'obésité, en permettant l'assimilation de la quasi-totalité des triglycérides ingérés. En outre, elle favorise l'absorption intestinale du cholestérol, dans
10 la mesure où la solubilité du cholestérol est augmentée dans les micelles mixtes, riches en acides gras.

L'action de la lipase pancréatique comporte plusieurs étapes : adsorption de l'enzyme, dans l'intestin, sur l'interface lipidique, en présence de sels biliaires et d'une colipase, dont le rôle est d'ancrer la lipase sur l'interface (C. Chapus
15 et al. , FEBS Letters, 1975, **58**, 1, 155-158), suivie de l'hydrolyse des liaisons esters *sn*-1,3 des triacylglycerols.

Ainsi la digestion des triglycérides fait intervenir des interactions lipase/colipase, régulées par une interface lipidique.

La lipase porcine, par exemple est une glycoprotéine comportant 449
20 aminoacides, dont les chaînes glycanes sont liées à l'asparagine (Asn) en position 166 ; elle comporte deux domaines séparés par la liaison Phe³³⁶-ala³³⁷ (M. Bousset-Risso et al., FEBS Letters, 1985, **182**, 2, 323-326). Chaque domaine porte un site de reconnaissance, à savoir : un site de reconnaissance interfaciale (domaine N-terminal), site de l'hydrolyse proprement dite et un site de reconnaissance pour son partenaire
25 protéique (domaine C-terminal), la colipase. Le domaine N-terminal (résidus 1-335), qui porte le centre actif de l'enzyme, est séparé du domaine C-terminal (résidus 336-449), par une zone étranglée très résistante à la protéolyse. Cette organisation en deux domaines répond aux deux fonctions spécifiques énoncées ci-dessus : le domaine N-terminal est responsable de la catalyse, alors que le domaine C-terminal est impliqué
30 dans la reconnaissance de la colipase (A. Abousalham et al., Protein Engineering, 1992, **5**, 1, 105-111).

La colipase est une petite molécule (10 kDa), très réticulée du fait de la présence de 5 ponts disulfures. Elle porte trois sites de reconnaissance essentiels à sa fonction, à savoir : un site de reconnaissance interfaciale (H. van Tilbeurgh et al., Nature, 1993, **362**, 814-820), un site de reconnaissance de la lipase, (C. Chaillan et al., 5 FEBS Letters, 1989, **257**, 2, 443-446 ; H. van Tilbeurgh et al., Nature, 1992, **359**, 159-162) et un site de reconnaissance micellaire (J. Hermoso et al., EMBO J., 1997, **16**, 18, 5531-5536). Ces trois sites sont topologiquement distincts.

Des études extensives réalisées depuis plusieurs années, ont permis d'approfondir les connaissances sur les relations structure/fonction du système 10 lipase/colipase pancréatiques (C. Chaillan et al., 1989, précité).

Des recherches structurales complémentaires concernant tant la lipase humaine (Winkler F.K. et al., Nature, 1990, **343**, 771-774) que la lipase de cheval (B. Kerfelec et al., Eur. J. Biochem., 1992, **206**, 279-287 ; Y. Bourne et al., J. Mol. Biol., 1994, **238**, 709-732) ont permis de confirmer l'existence des deux domaines 15 précités, dans des lipases de différentes origines.

La reconnaissance entre la lipase et la colipase fait intervenir en particulier des interactions hydrophobes (N. Mahé-Gouhier et al., BBA, 1988, **962**, 91-97) et électrostatiques.

Des expériences de pontage covalent entre la lipase et la colipase 20 pancréatiques (C. Chaillan et al. 1989, précité), ainsi que la résolution de la structure tridimensionnelle à 3,1 Å du complexe lipase/colipase (H. van Tilbeurgh et al., 1992, précité) ont conduit à l'identification sur les deux molécules des zones de reconnaissance, en solution.

Pour inhiber la lipase pancréatique et obtenir une activité thérapeu- 25 tique sur les hyperlipémies et l'obésité, différentes approches ont été proposées :

– l'utilisation d'inhibiteurs covalents, qui se fixent au centre actif de l'enzyme ; on peut citer, par exemple, la tétrahydrolipstatine (THL) [Brevet US 4 598 089 ; P. Hadvary et al., J. Biol. Chemistry, 1991, **266**, 4, 2021-2027 ; D. Hermier et al., FEBS Letters, 1991, **286**, 1 186-188] ; on obtient une inhibition complète de 30 l'activité lipolytique pour des doses de 1 mol de THL/mol d'enzyme (P. Hadvary et al., 1991, précité) ou des doses de 10 à 400 mg, deux fois par jour (J. Hauptman et al., Am. J. Clin. Nutr., 1992, **55**, 309S-313S) ; une telle méthode présente un certain

nombre d'inconvénients, dont le principal est le manque de spécificité : la tétrahydrolipstatine n'est en effet pas spécifique de la lipase pancréatique et inhibe d'autres lipases telles que la carboxylester lipase, la lipase gastrique et la lipase stimulée par les sels biliaires du lait humain ; et

- 5 – la modification de la nature de l'interface par adjonction de protéines amphiphiles (Gargouri Y. et al., J. Biol. Chem., 1985, **260**, 2268-2273), de détergents (Gargouri Y. et al., J. Lip. Res., 1983, **24**, 1336-1342) ou de fibres (Borel P. et al., Am. J. Clin. Nutr., 1989, **49**, 1192-1202) ; une telle méthode présente une efficacité très relative.

10 Ces deux approches comportent, en outre, un risque non négligeable d'effets indésirables (nausées...).

En conséquence, le Demandeur s'est donné pour but de pourvoir à un nouvel inhibiteur de la lipase pancréatique, qui réponde mieux aux besoins de la pratique que les inhibiteurs de la lipase de l'art antérieur, notamment en ce qu'il présente une réelle spécificité d'action vis-à-vis de la lipase pancréatique.

15 La présente invention a pour objet un peptide constitué d'un fragment C-terminal d'une lipase pancréatique, incluant le site de reconnaissance d'une colipase (dénommé ci-après peptide C-terminal), pour son utilisation comme médicament, notamment pour le traitement des hyperlipémies, des maladies cardiovasculaires et de l'obésité.

Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention ledit peptide est un fragment C-terminal d'une lipase pancréatique, sélectionnée parmi les lipases pancréatiques humaine, porcine ou chevaline, purifiées ou recombinantes.

25 De manière inattendue, le peptide C-terminal de ces différentes lipases pancréatiques permet effectivement de servir de leurre et d'instaurer une compétition entre ce peptide et la lipase native, pour la colipase et ainsi de diminuer de manière significative l'action lipolytique de ladite lipase.

L'administration d'un tel peptide freine l'action de la lipase pancréatique et inhibe, de manière surprenante, au moins en partie, l'hydrolyse des triglycérides alimentaires, qui ne seront donc pas absorbés (effet inhibiteur du peptide C-terminal sur la lipolyse).

30

En effet, l'affinité de ce peptide C-terminal est, *in vitro* :

- en solution, de l'ordre de 10^6 M, vis-à-vis de la colipase, alors que
- à l'interface lipidique, l'affinité du peptide C-terminal est de l'ordre de 2.10^8 M.

Pour obtenir l'action recherchée, c'est-à-dire une affinité à l'interface, de l'ordre
5 de 2.10^8 M, ledit peptide C-terminal est, de préférence, administré aux doses de 0,5 à
10 mg/jour réparties en 1 à 3 prises, correspondant à des doses de 0,2 à 10 mg par
prise.

La présente invention a également pour objet une composition pharmaceutique
comprenant le peptide C-terminal d'une lipase pancréatique, incluant le site de
10 reconnaissance d'une colipase, tel que défini ci-dessus et au moins un véhicule pharma-
ceutiquement acceptable.

Ladite composition pharmaceutique se présente avantageusement sous forme
unitaire apte à être administrée par voie orale, sélectionnée dans le groupe consistant
en capsules molles ou dures, comprimés, solutions, suspensions et émulsions.

15 Une telle composition pharmaceutique est, de préférence, destinée à une admi-
nistration orale, sous une forme gastro-résistante.

La présente invention a également pour objet d'autres applications dudit peptide
C-terminal de lipase pancréatique, par exemple en tant que réactif de diagnostic,
notamment dans la mise en oeuvre d'un test immunoenzymatique de dosage de la
20 lipase par une méthode de type compétitif et dans la mise en oeuvre de procédés de
lipolyse ménagée de substrats triglycéridiques.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres
dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des
exemples de mise en oeuvre de la présente invention, ainsi qu'aux dessins annexés,
25 dans lesquels :

- les figures 1 et 2 représentent les tracés de Scatchard obtenus à partir des
spectres différentiels [(colipase-peptide C-terminal)-peptide C-terminal] en solution
aqueuse pour la figure 1 et en présence d'une interface tributyrine/eau pour la figure 2 ;
- les figures 3 et 4 représentent l'inhibition de l'activité lipase par le peptide C-
30 terminal de la lipase (substrat : trioléine, phospholipides, sels biliaires totaux) en
l'absence (figure 3) ou en présence (figure 4) d'acide oléique.

Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

Exemple 1 : Isolement du Peptide C-terminal de porc.

5 - Purification de la lipase pancréatique et de la colipase

La lipase pancréatique porcine est purifiée comme décrit dans Rovey M. et al. (Biochim. Biophys. Acta, 1978, **525**, 373-379), à partir d'une poudre pancréatique acétonique.

La purification de la colipase de porc est réalisée selon C. Chapus et al. (Eur. J. Biochem., 1982, **115**, 99-105).

Les concentrations en protéine sont déterminées à 280 nm, en utilisant un coefficient d'absorption moléculaire de $6,65 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, pour la lipase et de $0,4 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ pour la colipase.

15 - Obtention, purification et analyse du peptide C-terminal de la lipase pancréatique de porc

100 mg de lipase porcine est dissous dans 20 ml de tampon bicarbonate d'ammonium 60 mM, pH 8,5, contenant de la benzamidine 1 mM.

1 mg de chymotrypsine traitée au TLCK (tosyl-lysine chlorométhyl cétone) est ajoutée et le mélange est incubé à 37°C, pendant 18 heures. Des aliquots
20 sont prélevés à différents moments, analysés par SDS-PAGE et testés pour leur activité lipasique.

L'attaque chymotrypsique est stoppée par addition de PMSF 0,2 mM (phénylméthyl sulfonyl fluorure).

Le mélange de digestion est soumis à un tamisage moléculaire sur
25 colonne Ultrogel AcA 54 (2,5 x 200 mm), équilibrée avec un tampon Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, contenant 0,2 M de NaCl et 1 mM de benzamidine ; l'élution est réalisée avec le même tampon.

L'analyse en aminoacides est réalisée avec un analyseur automatique (Beckman 6300), après 24 heures d'hydrolyse des échantillons, dans des tubes scellés
30 contenant de l'HCl tridistillé 6 M. La séquence N-terminale du peptide est obtenue par dégradation, selon la méthode d'Edman, en utilisant un séquenceur (Applied Biosystems 470A). Les phénylthiohydantoïnes obtenues sont analysées par HPLC

(colonne C18, Brownlee, 5 μ m, 2,1 x 220 mm). Elles sont éluées en utilisant un gradient de méthanol (10-46 %) dans un tampon acétate de sodium 5 mM, pH 4,84.

Les fragments obtenus sont soumis à une électrophorèse sur gel (PAGE-SDS), selon la technique de Laemmli U.K. (Nature, 1970, **227**, 680-685). Les protéines et les fragments peptidiques sont colorés au bleu brillant de Coomassie et des tranches de gel sont décolorées à l'aide d'un mélange éthanol:acide acétique:eau (5:7,5:87,5 vol/vol).

Les peptides générés par l'attaque protéolytique sont chargés, en double, sur des fragments de gel de polyacrylamide à 18 % et séparés par électrophorèse en présence de SDS.

Après transfert sur PVDF (polyvinylidène difluorure), une piste est colorée pour localiser le peptide C-terminal et l'autre est coupée pour réaliser le séquençage de cette séquence.

L'analyse du peptide C-terminal, isolé et purifié, par SDS-PAGE ainsi que l'analyse en aminoacides, montre que ce peptide a le poids moléculaire et la composition en aminoacides attendue (voir N. Mahé-Gouhier et al., 1988, précité et M. Bousset-Risso et al., 1985, précité). Le séquençage de la partie N-terminale de la chaîne présente la séquence suivante : Ala-Arg-Trp-Arg-Tyr-Lys-Val-Ser, montrant clairement que la chymotrypsine clive la séquence au niveau de la liaison Phe³³⁶-Ala³³⁷, qui est à la jonction des domaines C- et N- terminaux de la lipase pancréatique.

Exemple 2 : Mise en évidence de l'interaction peptide C-terminal de la lipase porcine avec la colipase, en solution aqueuse.

L'interaction domaine C-terminal/colipase en milieu aqueux (en l'absence d'interface lipidique) a été mesurée par spectrofluorométrie.

Les spectres d'émission de fluorescence du peptide C-terminal sont enregistrés sur un spectrofluoromètre Kontron (SFM235), équipé d'une cellule thermostatée et d'un système d'agitation magnétique. Ce spectrofluoromètre est en outre connecté à un ordinateur (Apple IIe).

Toutes les expériences ont été réalisées à 25°C et à pH 7,5. La longueur d'onde d'excitation de 290 nm a été choisie parce que la colipase pancréatique de porc ne comporte pas de résidus tryptophane et les changements dans l'émission de

fluorescence peuvent ainsi être attribués aux résidus tryptophane du peptide C-terminal, lorsqu'il interagit avec la colipase.

Le spectre d'émission de fluorescence du peptide C-terminal à une concentration finale de $0,26 \cdot 10^{-6}$ M dans le tampon Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, contenant du NaCl 0,1 M, est mesuré entre 300 et 400 nm. La solution mère de colipase est préparée dans le même tampon ; la concentration de colipase varie de $2,8 \cdot 10^{-8}$ à $1,4 \cdot 10^{-6}$ M.

L'évaluation de la constante de dissociation est déterminée en utilisant la formule de Scatchard suivante :

$$\frac{L_b}{L_f} = \frac{nP_o}{K_d} - \frac{L_b}{K_d}$$

dans laquelle L_b et L_f correspondent aux concentrations de colipase liée et de colipase libre à l'équilibre, P_o la concentration totale en peptide C-terminal et K_d , la constante de dissociation.

- Résultats

Les spectres différentiels [(colipase-peptide C-terminal)-peptide C-terminal] montrent une diminution de l'émission de fluorescence. Les tracés de Scatchard, obtenus à partir de ces spectres permettent d'évaluer la constante de dissociation colipase/peptide C-terminal à 10^{-6} M en solution, dans les conditions précisées ci-dessus (figure 1).

Dans cette figure 1, les abscisses représentent la quantité de peptide C-terminal lié [complexe colipase/C-terminal(TC)] et les ordonnées représentent le rapport peptide C-terminal lié/peptide C-terminal libre [complexe colipase/C-terminal(TC)/C-terminal libre(C) (TC/T)].

Exemple 3 : Mise en évidence de l'interaction domaine C-terminal de la lipase porcine avec la colipase et action inhibitrice *in vitro* sur la lipase, à l'interface (substrat : tributyrine).

- conditions de mesure de l'inhibition des activités lipase et colipase par le peptide C-terminal de la lipase, en présence d'une interface

L'activité lipasique est mesurée par titrimétrie, à 25°C dans un milieu constitué de tampon Tris-HCl 1 mM à pH 7,5, contenant du NaCl 0,1 M et du CaCl_2

5 mM, en présence de taurodésoxycholate de sodium (NaTDC) à une concentration finale de 1 mM.

L'activité colipasique est mesurée dans les mêmes conditions, mais en présence de NaTDC 4 mM.

5 Le volume final est de 15 ml ; le substrat utilisé est la tributyrine émulsifiée, à une concentration finale de 0,11 M.

Les activités sont mesurées en l'absence et en présence de quantités croissantes d'une solution mère de peptide C-terminal (10^{-6} M).

- inhibition de l'activité lipase par le peptide C-terminal de la lipase

10 Le rapport molaire lipase/colipase est égal à 1 et la concentration finale de lipase et de colipase est de $0,19 \cdot 10^{-9}$ M.

La concentration de peptide C-terminal varie de $0,2 \cdot 10^{-9}$ à $30 \cdot 10^{-9}$ M.

Le taux d'inhibition maximum de l'activité lipase enregistré dans ces conditions est de 50 % environ.

15 - inhibition de l'activité colipase par le peptide C-terminal de la lipase
Le rapport molaire lipase/colipase est égal à 0,75 (lipase $0,19 \cdot 10^{-9}$ M ; colipase $0,25 \cdot 10^{-9}$ M). La concentration en peptide C-terminal varie comme précédemment. Le taux d'inhibition maximum de l'activité colipase enregistré est également de 50 %. La constante de dissociation estimée à partir du tracé de Scatchard est de
20 $2 \cdot 10^{-8}$ M (figure 2).

Ces résultats montrent que, en solution, l'affinité de la colipase pour le peptide C-terminal est du même ordre de grandeur que l'affinité de la colipase pour la lipase et que cette affinité est augmentée d'un facteur 50 à 100 en présence d'une interface tributyrine/eau.

25 **Exemple 4 : Mise en évidence de l'interaction du domaine C-terminal de la lipase avec la colipase en présence d'une interface lipidique : inhibition de l'activité lipasique par le domaine C-terminal *in vitro* (substrat physiologique : trioléine émulsifiée).**

Les études cinétiques d'inhibition de la lipase par le domaine C-terminal ont été réalisées en présence d'une interface lipidique plus physiologique qu'à
30 l'exemple 3, le substrat utilisé étant de la trioléine émulsifiée.

L'activité de la lipase est mesurée par titrimétrie à l'aide d'un pH stat, à 25°C, sur une émulsion de trioléine dans des conditions où l'activité de l'enzyme est strictement dépendante de la présence de la colipase.

Le milieu réactionnel (15 ml) contient :

- 5 - trioléine 8 mM
- taurodésoxycholate de sodium 4 mM
- Tris/HCl 1 mM, pH 7,5, CaCl₂ 5 mM, NaCl 0,1 M.

Les expériences de compétition sont réalisées en présence de lipase et colipase natives et du domaine C-terminal obtenu par protéolyse.

10 Inhibition de l'activité lipase par le domaine C-terminal :

Les concentrations finales de lipase et colipase sont de $1,7 \times 10^{-9}$ M et $1,4 \times 10^{-9}$ M respectivement.

Le rapport molaire lipase/colipase est égal à 1,2. Pour une concentration en domaine C-terminal égale à 2×10^{-7} M, le taux d'inhibition maximum observé
15 est de 50 % environ.

Exemple 5 : Mise en évidence de l'interaction du domaine C-terminal de la lipase porcine avec la colipase et action inhibitrice *in vitro* sur la lipase, à l'interface, dans des conditions plus physiologiques (substrat : trioléine, phospholipides et sels biliaires totaux).

20 - L'inhibition de l'activité lipase par le peptide C-terminal de la lipase est mesurée comme décrit dans l'exemple 3, mais les substrats utilisés consistent en des émulsions de triglycérides à chaînes longues (trioléine 10 mM) en présence de phospholipides (rapport trioléine/lécithine = 20) et d'un mélange de sels biliaires totaux (6 mM) en l'absence (figure 3) ou en présence (figure 4) d'acide oléique (5 mM).
25 L'acide oléique est un produit de la lipolyse. Lors de l'arrivée du bol alimentaire dans le duodénum, une partie des triglycérides alimentaires a été hydrolysée et des acides gras à chaîne longue (tels l'acide oléique) sont présents dans le duodénum. Ces acides gras libres vont se combiner à la sécrétion biliaire et se retrouver également en partie à l'interface lipidique. Ils jouent donc un rôle dans la lipolyse.

30 - Résultats :

Dans tous les cas, 50 % d'inhibition de la lipolyse sont obtenus en présence de $2 \cdot 10^{-7}$ M de peptide C-terminal, ce qui représente une augmentation de 5

fois de l'affinité du domaine C-terminal pour la colipase en présence de l'interface lipidique, par comparaison avec les valeurs obtenues en l'absence de l'interface lipidique (figure 1).

Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite nul-
5 lement à ceux de ses modes de mise en oeuvre, de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle en embrasse au contraire toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écarter du cadre, ni de la portée de la présente invention.

REVENDICATIONS

1°) Peptide constitué d'un fragment C-terminal de lipase pancréatique incluant le site de reconnaissance d'une colipase, pour son utilisation comme médicament.

5 2°) Peptide selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il correspond à un fragment d'une lipase pancréatique sélectionnée parmi les lipases pancréatiques humaine, porcine ou chevaline, purifiées ou recombinantes.

3°) Peptide selon la revendication 1 ou la revendication 2, pour son utilisation dans le traitement des hyperlipémies.

10 4°) Peptide selon la revendication 1 ou la revendication 2, pour son utilisation dans le traitement de l'obésité.

5°) Peptide selon la revendication 1 ou la revendication 2, pour son utilisation dans le traitement des troubles cardiovasculaires.

15 6°) Composition pharmaceutique comprenant un peptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 et au moins un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

7°) Composition pharmaceutique selon la revendication 6, caractérisée en ce que la quantité dudit peptide est comprise entre 0,2 et 10 mg.

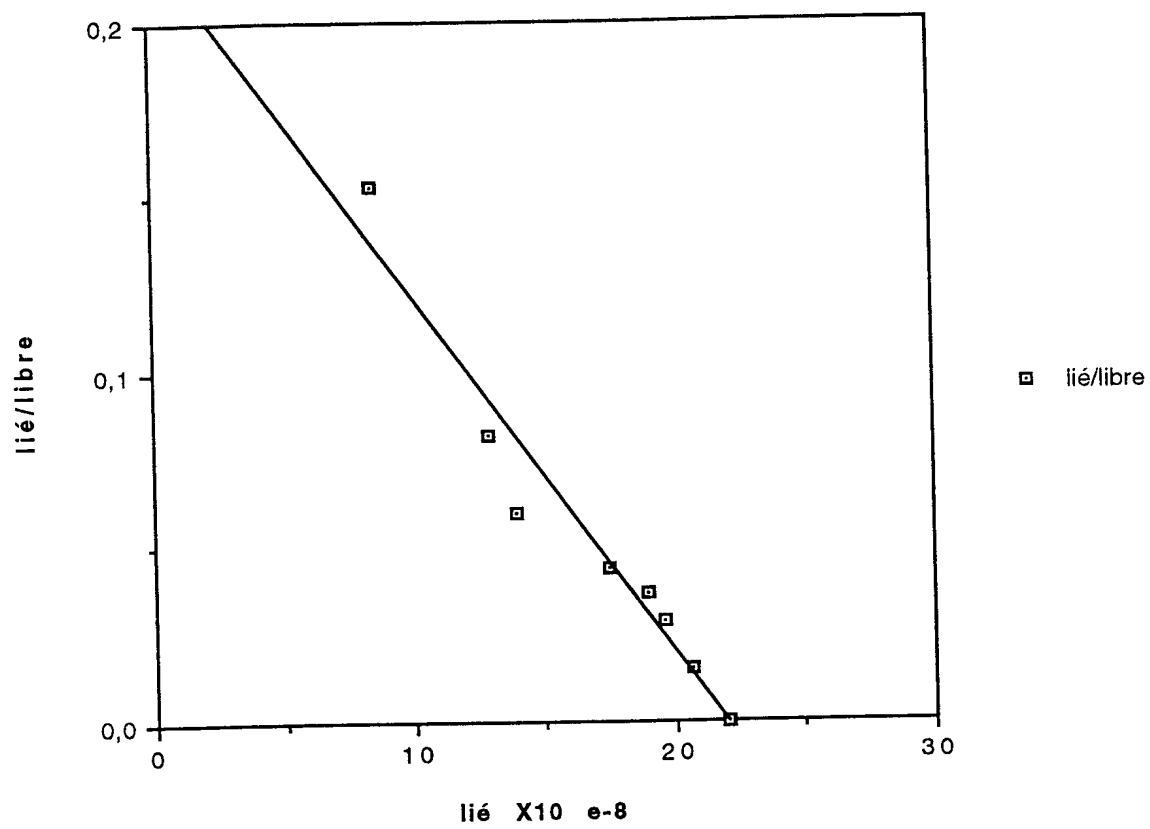
20 8°) Composition pharmaceutique selon la revendication 6 ou la revendication 7, caractérisée en ce qu'elle se présente sous une forme unitaire apte à être administrée par voie orale, sélectionnée dans le groupe consistant en capsules molles ou dures, comprimés, solutions, suspensions et émulsions.

9°) Composition selon la revendication 8, caractérisée en ce que ladite forme unitaire est gastro-résistante.

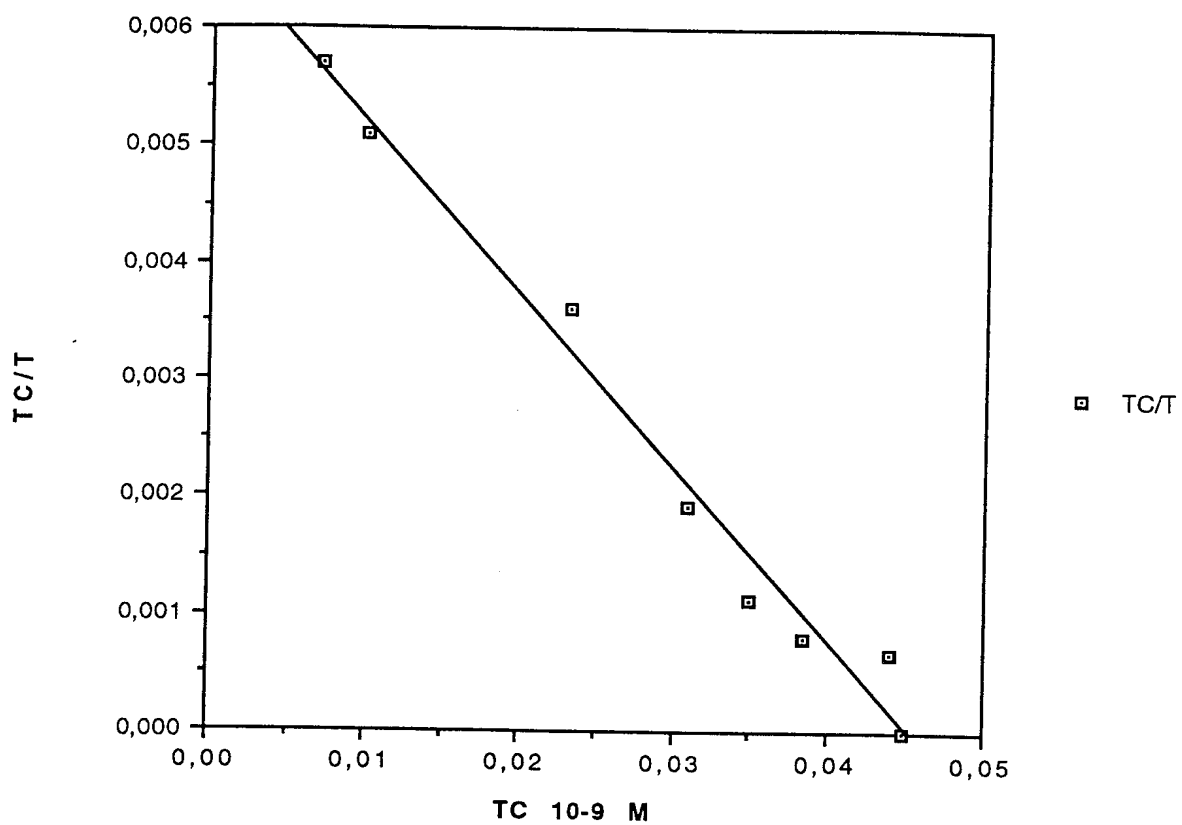
25 10°) Réactif de diagnostic, caractérisé en ce qu'il est constitué par un peptide selon la revendication 1 ou la revendication 2.

11°) Procédé de lipolyse ménagée de substrats triglycéridiques, caractérisé en ce qu'il met en oeuvre un peptide selon la revendication 1 ou la revendication 2.

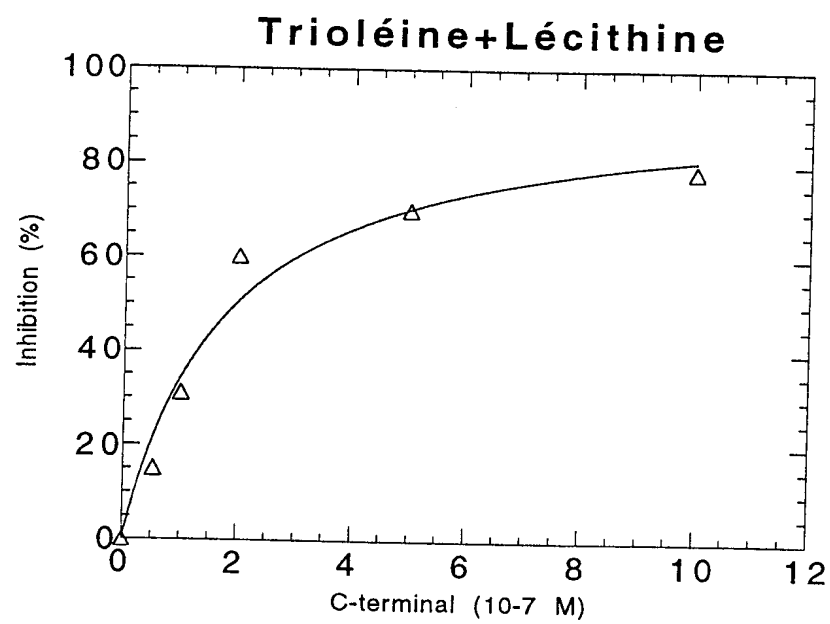
1 / 4

FIGURE 1

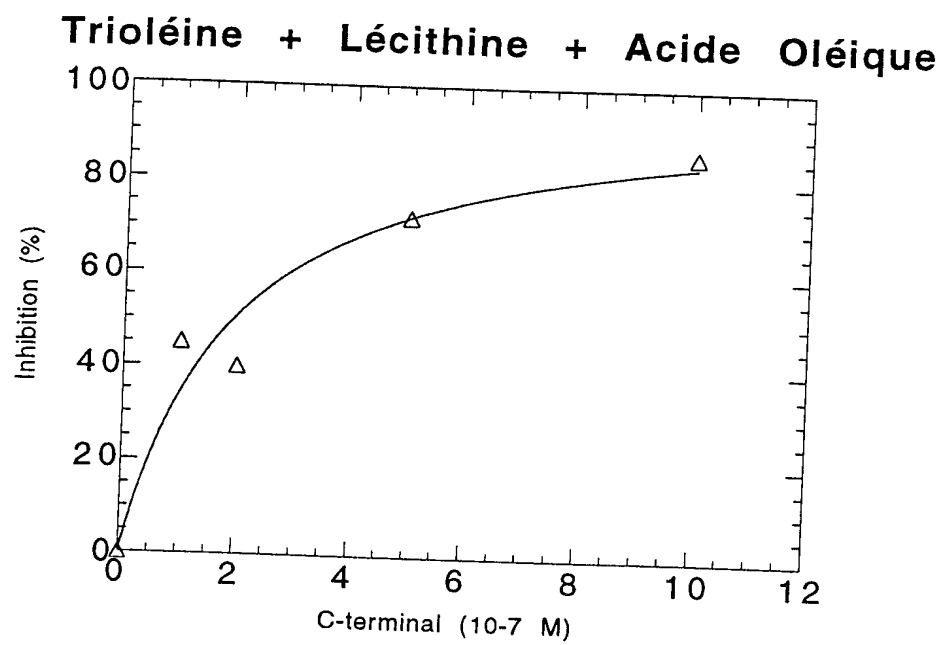
2/4

FIGURE 2

3/4

FIGURE 3

4/4

FIGURE 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 98/00009

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C07K14/47 A61K31/00 A61K38/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07K C12N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BOUSSET-RISSO M. ET AL.: "Limited proteolysis of porcine pancreatic lipase. Lability of the Phe 335 - Ala 336 bond towards chymotrypsin" FEBS LETTERS, vol. 182, no. 2, March 1985, AMSTERDAM NL, pages 323-326, XP002041837 cited in the application see the whole document --- -/--	1,2



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

8 May 1998

Date of mailing of the international search report

18/05/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Panzica, G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 98/00009

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CHAPUS C. ET AL.: "Role of colipase in the interfacial adsorption of pancreatic lipase at hydrophylic interfaces" FEBS LETTERS, vol. 58, no. 1, October 1975, AMSTERDAM NL, pages 155-158, XP002041838 cited in the application	1,2
Y	see the whole document ---	3,4
X	MAHE-GOUHIER N. AND LEGER C.L.: "Immobilized colipase affinities for lipases B, A, C, and their terminal peptide (336-449): the lipase recognition site lysine residues are located in the C-terminal region" BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, vol. 962, 1988, AMSTERDAM, NL, pages 91-97, XP002041839 cited in the application see abstract see page 92, column 1, paragraph 5 - column 2, paragraph 1 see page 96, column 1, paragraph 5 - page 97 ---	1,2
Y	MELIA A.T. ET AL.: "The effect of orlistat, an inhibitor of dietary fat absorption, on the absorption of vitamins A and E in healthy volunteers" JOURNAL OF CLINICAL PHARMACOLOGY, vol. 36, no. 7, July 1996, pages 647-653, XP002043023 see abstract ---	3,4
A	CHENG Q. ET AL.: "C-terminal domain of apolipoprotein C II as both activator and competitive inhibitor of lipoprotein lipase" BIOCHEMISTRY JOURNAL, vol. 269, no. 2, 15 July 1990, pages 403-407, XP002043024 see the whole document ---	3,4
A	EP 0 399 379 A (MODROVICH IVAN E.) 28 November 1990 see abstract -----	11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No

PCT/FR 98/00009

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0399379 A	28-11-90	US 5248598 A	28-09-93
		CA 2017509 A,C	25-11-90
		DE 69030135 D	17-04-97
		DE 69030135 T	19-06-97
		ES 2098231 T	01-05-97
		JP 2700501 B	21-01-98
		JP 3067600 A	22-03-91
		US 5378609 A	03-01-95
<hr/>			

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR 98/00009

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 6 C07K14/47 A61K31/00 A61K38/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C07K C12N A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	BOUSSET-RISSO M. ET AL.: "Limited proteolysis of porcine pancreatic lipase. Lability of the Phe 335 - Ala 336 bond towards chymotrypsin" FEBS LETTERS, vol. 182, no. 2, mars 1985, AMSTERDAM NL, pages 323-326, XP002041837 cité dans la demande voir le document en entier --- -/--	1,2



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

° Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

8 mai 1998

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

18/05/1998

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Panzica, G

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	CHAPUS C. ET AL.: "Role of colipase in the interfacial adsorption of pancreatic lipase at hydrophylic interfaces" FEBS LETTERS, vol. 58, no. 1, octobre 1975, AMSTERDAM NL, pages 155-158, XP002041838 cité dans la demande	1,2
Y	voir le document en entier ---	3,4
X	MAHE-GOUHIER N. AND LEGER C.L.: "Immobilized colipase affinities for lipases B, A, C, and their terminal peptide (336-449): the lipase recognition site lysine residues are located in the C-terminal region" BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, vol. 962, 1988, AMSTERDAM, NL, pages 91-97, XP002041839 cité dans la demande voir abrégé voir page 92, colonne 1, alinéa 5 - colonne 2, alinéa 1 voir page 96, colonne 1, alinéa 5 - page 97 ---	1,2
Y	MELIA A.T. ET AL.: "The effect of orlistat, an inhibitor of dietary fat absorbtion, on the absorbtion of vitamins A and E in healthy volunteers" JOURNAL OF CLINICAL PHARMACOLOGY, vol. 36, no. 7, juillet 1996, pages 647-653, XP002043023 voir abrégé ---	3,4
A	CHENG Q. ET AL.: "C-terminal domain of apolipoprotein C II as both activator and competitive inhibitor of lipoprotein lipase" BIOCHEMISTRY JOURNAL, vol. 269, no. 2, 15 juillet 1990, pages 403-407, XP002043024 voir le document en entier ---	3,4
A	EP 0 399 379 A (MODROVICH IVAN E.) 28 novembre 1990 voir abrégé -----	11

Dem Internationale No
PCT/FR 98/00009

Formulaire PCT/ISA/210 (annexe familles de brevets) (juillet 1992)